

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE KOMBINIERTE CHEMOTHERAPIE EINES
MENSCHLICHEN TRANSPLANTATTUMORS MIT ZWEI
ZYTOSTATIKA IM VERGLEICH ZUR
EINZELANWENDUNG DER GLEICHEN SUBSTANZEN

von
Christa Hertlein
aus
Nürnberg

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. L. Demling

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE KOMBINIERTE CHEMOTHERAPIE EINES
MENSCHLICHEN TRANSPLANTATTUMORS MIT ZWEI
ZYTOSTATIKA IM VERGLEICH ZUR
EINZELANWENDUNG DER GLEICHEN SUBSTANZEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Christa Hertlein
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. H. V a l e n t i n
Referent: Professor Dr. S. W i t t e
Korreferent: Professor Dr. L. D e m l i n g

Tag der mündlichen Prüfung : 16. April 1970

M e i n e n E l t e r n

i n D a n k b a r k e i t

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
Einleitung	1
Material und Methodik	2
Ergebnisse	6
Diskussion	30
Zusammenfassung	33
Literatur	35

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KOMBINIERTE CHEMOTHERAPIE EINES MENSCHLICHEN TRANSPLANTATTUMORS MIT ZWEI ZYTOSTATIKA IM VERGLEICH ZUR EINZELANWENDUNG DER GLEICHEN SUBSTANZEN

Unter Zytostatika faßte Heilmeyer (1) Stoffe zusammen, die die Fähigkeit haben, ohne größere Schädigung des Organismus neoplastisch wucherndes Gewebe zu hemmen. Da aber Zytostatika nicht spezifisch auf maligne Zellen, sondern in gleichem Sinne auf alle schnell proliferierenden Zellen wirken, und die Differenz zwischen der tumorwirksamen und der allgemeintoxischen Dosis gering ist (2), wird der Indikationsbereich dieser Substanzen begrenzt. Um die bereits bei sogenannten therapeutischen Dosen auftretenden Nebenwirkungen wie Knochenmarksuppressionen, Erbrechen etc. zu verzögern, versucht man, zwei oder mehrere Substanzen - jeweils niedrig dosiert - gleichzeitig oder nacheinander zu verabreichen (3). Mit einer solchen kombinierten Therapie sollen die toxischen Wirkungen auf den Organismus reduziert und die tumorhemmenden Wirkungen erhöht werden, so dass therapeutisch ein Synergismus beider Substanzen erzielt werden kann. In entsprechenden Versuchen fanden Goldin und Mantel (3) eine Reduktion der Toxizität bei gleicher Antitumorwirkung bzw. eine erhöhte Aktivität dem Tumor gegenüber bei gleicher Toxizität. Dieser therapeutische Effekt hängt sowohl von der Dosierung (5.,6) als auch von dem Eingriff der betreffenden Substanzen in den Zellstoffwechsel (3) und die Zellteilung (4) ab.

Die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosierung ist an Hand weniger Beispiele ersichtlich: Kline und Venditti (7) hatten bei Mäusen mit Leukämie L 1210 die besten Erfolge mit hohen bis maximalen Dosen von Methotrexat in Kombination mit niedrigen, bei alleiniger

Verabreichung unwirksamen Dosen von 5-Fluoro-Uracil. Mantel(6) fand unter den gleichen Bedingungen, daß $1/2$ bis $1/4$ der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) von Azaserin (AZS) und $1/4$ bis $1/10$ der maximal tolerierbaren Dosis von 6-Mercapto-purin (MP) wirksamer sind als jede Substanz allein. In der Klinik sind entsprechende Fragestellungen exakt kaum zu beantworten. Als ein Tiermodell, das den klinischen Verhältnissen möglichst nahe ist, haben wir ausgedehnte Erfahrungen an einem Humantumor gesammelt, der zur dauerhaften Transplantation in das Wirtstier gebracht wurde und dabei Humanantigen (8) und die menschliche Karyotype (14) während der fortdauernden Transplantation beibehält.

Um herauszufinden, ob die kombinierte Chemotherapie an diesem Humantumor wirksamer ist als bei Verabreichung einer einzelnen Substanz, haben wir in den folgenden Versuchen die Kombination verschiedener Zytostatika gleicher und unterschiedlicher Gruppen in Abhängigkeit von der Dosierung untersucht. Wir haben die Substanzen einzeln in einer maximal tolerierbaren Dosis und halben maximal tolerierbaren Dosis, und letztere in Kombination von zwei Mitteln gegeben.

MATERIAL UND METHODIK

Der zur Verfügung stehende Tumor HAd.Nr.1 wurde von Toolan (9) im August 1955 am Sloan Kettering Institute for Cancer Research in New York erstmalig auf mit Cortison vorbehandelte Ratten überpflanzt. Bei dem Tumor handelte es sich um ein entdifferenziertes Adeno-Carcinom des Darmes, bei dem mikroskopisch Nester von Siegelringzellen mit Mukoid-Produktion zu finden waren. Der Tumor wurde in Serienpassagen in den Backentaschen

(BT) des Goldhamsters (Mesocricetus auratus) gehalten. Unter aseptischen Bedingungen wurden die Tumoren drei bis vier Wochen nach Überpflanzung herausgeschnitten, mit der Hand homogenisiert und eine 20% Suspension hergestellt. Zur Herstellung der sterilen Lösung wurden Penicillin (5mg) und Streptomycin (60mg) mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (100 ml) versetzt und als Zellaufschwemmung je BT 0,1 ml mit einer dünnen Kanüle in beide Backentaschen von Hamstern beiderlei Geschlechts (Gewicht 45 - 65 g) injiziert. Die Tumoren wuchsen ohne Vorbehandlung der Wirtstiere an. Wir haben das Volumen der Tumoren gemessen, das Gewicht und den Zustand der Tiere (struppiges Fell, Somnolenz, Diarrhoe) kontrolliert und die Letalität^x festgestellt. Die Tiere bekamen Altromin-R-Futter mit Zusatz von Körnermischfutter, Haferflocken und Karotten zweimal wöchentlich.

Das Tumolvolumen wurde mit Hilfe einer Schublehre entsprechend der Länge, Breite und Dicke des Tumors an der vorgestülpten Backentasche fortlaufend gemessen. Dazu wurden die Tiere mit Evipan-Natrium^R narkotisiert (100mg/kg KG i.p.). Die Messung begann am 6.Tag nach der Überpflanzung und erfolgte dreimal wöchentlich bis zu ein, vier und acht Tagen nach Therapie-Ende. Die intraperitoneale Applikation des Zytostatikums begann am Tag der zweiten Messung und erstreckte sich über sieben fortlaufende Tage. Die folgenden Messungen des Tumolvolumens wurden als Vielfache der ersten Messung ("Wachstumsfaktor") ausgedrückt (11, 20). Um das Tumor-Volumen in Kurven anschaulich darzustellen, wurde an jedem Meßtag der Mittelwert der errechneten

^xLetalität ist die Zahl der Todesfälle pro 100 behandelte Tiere

ten Wachstumsfaktoren auf halblogarithmischem Papier eingezeichnet. Abweichungen vom Mittelwert wurden mit folgender Formel berechnet: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (n-x)^2}{n(n-1)}}$, wobei σ die mittlere Abweichung der Mittelwerte, n die Anzahl der Mittelwerte einer Versuchsreihe, x die Abweichung jedes Mittelwertes von der entsprechenden Kontrolle bedeutete. Zur Darstellung der Kurven wurde in der Ordinate der errechnete Wachstumsfaktor, in der Abszisse die Meßtage bis acht Tage nach Therapie-Ende aufgetragen. Die mittlere Abweichung wurde anschließend an den betreffenden Meßtagen eingetragen (Pfeile). In diesem Schwankungsbereich bewegte sich die Tumorchemmung einer Versuchsreihe am jeweiligen Tage (Abbildg.4, 6 etc.).

Den mittleren Wachstumsfaktor der Kontrolltiere setzten wir gleich 100% und errechneten daraus die Tumorchemmung bei den behandelten Tieren. Die prozentuale Hemmung an den jeweiligen Tagen wurde in Form von Säulen dargestellt (Abb.1, 2, 3 etc.) (11, 12).

Die Versuche wurden jeweils in sechs Gruppen zu 10 - 15 Tieren zusammengefaßt:

Der ersten Gruppe injizierten wir die Tagesdosis (TD) der Substanz A, der zweiten Gruppe die Tagesdosis der Substanz B. Der dritten und vierten Gruppe verabreichten wir die halbe Tagesdosis (1/2TD) der Substanz A oder B. Der fünften Gruppe wurden die halbtgen Tagesdosen der Substanzen A und B zusammen injiziert, während die 6. Gruppe unbehandelt als Kontrolle diente.

Wir beurteilten die Wirkung dieser Medikament-Kombinationen als: Addition, wenn $1/2 A + 1/2 B = A$ oder B ,

Synergismus, wenn $1/2 A + 1/2 B > A$ oder $> B$,
Antagonismus, wenn $1/2 A + 1/2 B < A$ oder $< B$,
wobei A die eine Substanz, B die andere jeweils in der Tagesdosis, $1/2 A$ demnach die $1/2$ Tagesdosis bedeutete.

Die Zytostatika wurden täglich frisch mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 0,1 ml/10 g Körpergewicht (KG) abgestimmt. Die Tiere mit kombinierter Zytostatikatherapie bekamen von jedem Präparat die halbe Tagesdosis gleichzeitig injiziert. Die Toxizität der Medikation wurde aus der relativen Letalität (Letalität der behandelten Tiere minus der der Kontrolltiere), dem Allgemeinzustand der Tiere und der Gewichtsabnahme im Vergleich zu den Kontrolltieren ermittelt.

In unseren Versuchen wurden folgende Zytostatika verwendet:

I) Aus der Gruppe der ANTIMETABOLITEN:

1. 5-Fluor-uracil (5-Fluoro-Uracil "Roche"),
2. Amethopterin (Methotrexat^R),
3. Cytosin-Arabinosid (Mack-1075).

II) Aus der Gruppe der ALKYLANTIEN:

1. Cyclophosphamid (Endoxan^R),
2. Trisäthylenimino-benzochinon (Trenimon "Bayer").

III) Aus der Gruppe der ANTIBIOTIKA:

Actinomycin C (Sanamycin^R)

IV) Aus der Gruppe der ANTIMITOTIKA:

Podophyllinsäure-Äthylhydrazid (Proresid^R).

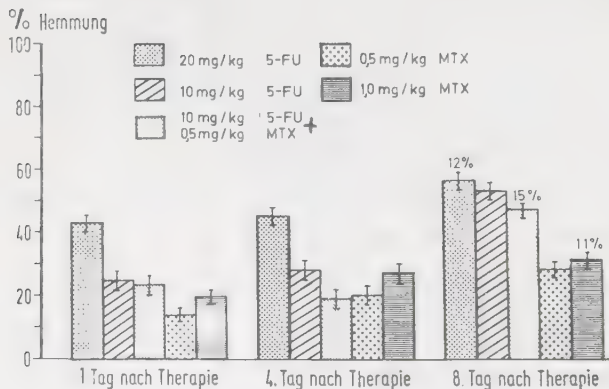
V) N-isopropylbenzamid (Natulan^R).

ERGEBNISSE:

I. Kombination von 5-Fluoro-Uracil (5-FU) und Methotraxat (MTX):

In der ersten Versuchsreihe konnten wir mit der Kombination der 1/2 Tagesdosis (TD) beider Substanzen kein besseres Ergebnis erzielen als bei Einzelverabreichung jeder Substanz mit 1/2 Tagesdosis. Die Letalität der kombiniert behandelten Tiere entsprach derjenigen der mit der Tagesdosis jeder Substanz behandelten (Letalität von 15, 11, 12%). (Abb.1)

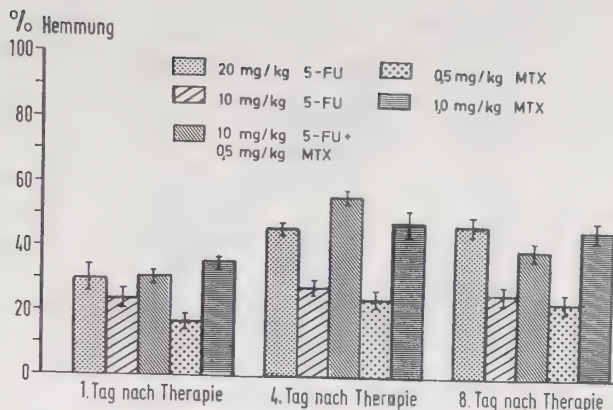
1.



Wachstumshemmung des Humantumors HAd Nr. 1 in der Hamsterbackentasche nach einmaliger Gabe von 5-FU in TD, 1/2 TD, 1/2 TD 5-FU in Kombination mit 1/2 TD MTX, 1/2 TD MTX und TD MTX. - Die einzelnen Striche zeigen den Schwankungsreich am jeweiligen Meßtag an.

In einem parallel laufenden Versuch (Abb. 2) fanden wir unter gleichen Bedingungen wie (1) an einer größeren Anzahl von Hamstern (15 pro Versuch) am 4. und 8. Tag nach Therapie-Ende

2.

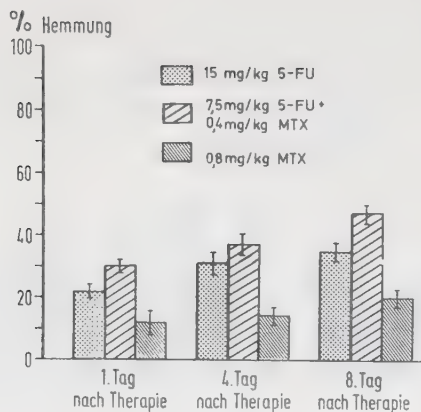


Wachstumshemmung des Humantumors HAD bei besseren Lebensbedingungen der Tiere (höheres Gewicht, Futter).

eine Addition der Wirksamkeit beider Substanzen. Die Letalität betrug bei der Einzelverabreichung von 20mg/kg KG 5-FU 11%, bei der von 1,0 mg/kg MTX 10%, bei der Kombination von 0,5 mg/kg MTX und 10 mg/kg 5-FU dagegen 0%. Dies sprach für eine bessere Verträglichkeit der geringeren Dosis beider Substanzen zusammen.

Im dritten Versuch reduzierten wir die tägliche Dosis von 5-FU auf 15 mg/kg, die von Methotrexat auf 0,8 mg/kg. Bei der Applikation halber Tagesdosen zusammen, sowie bei der einzelnen Verabreichung von der Tagesdosis jeder Substanz trat keine Toxizität bei den Tieren auf. Eine Potenzierung der Wirksamkeit bei den mit beiden Substanzen in halber Tagesdosis behandelten Tieren ist auf Abb. 3 und 4 deutlich ersichtlich.

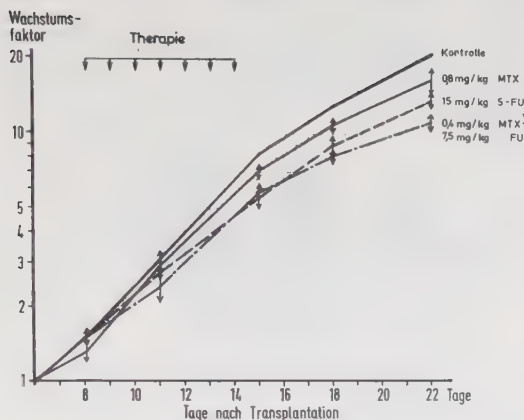
3.



Einfluß einer niedrig dosierten Kombinations-
Therapie mit 7,5 mg/kg KG 5-FU und 0,4 mg/kg KG MTX.

Aus dem Kurvenverlauf der Tumolvolumina zeigte sich ebenfalls bei der Behandlung mit beiden Substanzen zusammen ab 1. Tag nach Therapie-Ende eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums gegenüber den Tieren, die mit der Tagesdosis jeder Substanz allein behandelt wurden (Abb.4).

4.

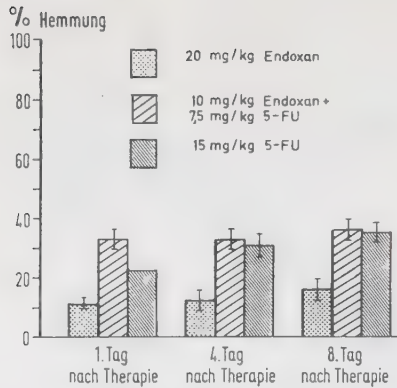


Wachstumsverhalten des Humantumors HAd bei niedriger Dosierung von MTX 0,4 mg/kg und 7,5 mg/kg 5-FU kombiniert, und einzeln verabreicht im Vergleich zur Kontrolle. (Pfeile zeigen Schwankungsbereich)

II. Kombination von 5-Fluoro-Uracil (5-FU) und Endoxan:

In dieser Versuchsreihe kombinierten wir 5-FU mit Endoxan. Wir begannen mit niedrigen Dosen von Endoxan (20 mg/kg KG) und 5-FU (15 mg/kg KG) als Tagesdosis. Abbildung 5 zeigte eine deutliche Potenzierung am 1. und 4. Tag nach Therapie-Ende, am 8. Tag eine Addition.

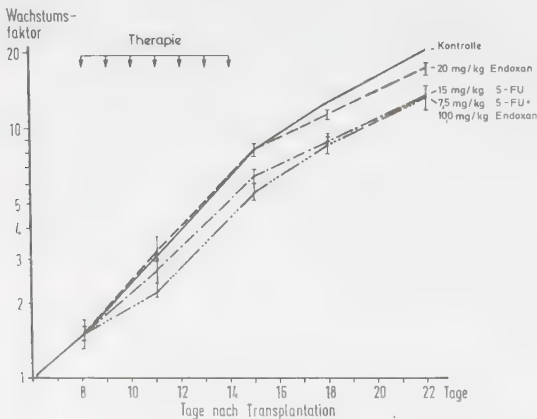
5.



Vergleich der Wachstumshemmung nach einer niedrig dosierten Behandlung mit Endoxan, der Kombination mit 5-FU und 5-FU allein verabreicht.

Dies war aus Abbildung 6 noch besser zu ersehen. Am 8. Tag nach Therapie-Ende entsprach die Tumorphemmung bei kombinierter Therapie halber Tagesdosen der Hemmung der mit 15 mg/kg 5-FU behandelten Tiere.

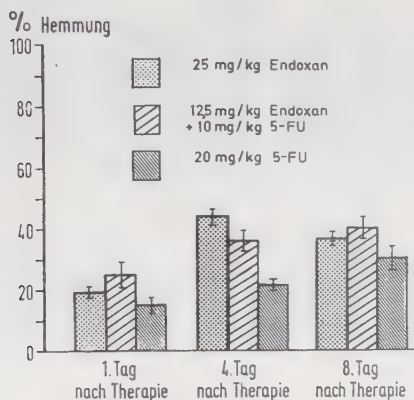
6.



Vergleich des Wachstumsverhaltens unter gleichen Bedingungen wie bei Abb.5

In Abbildung 7 erhöhten wir die Dosis von 5-FU auf 20 mg/kg KG und die von Endoxan auf 25 mg/kg KG. Am 1. Tag nach Therapie-Ende entsprach die Tumorphemmung einer Potenzierung, am 4. und 8. Tag einer Addition. Die Letalität betrug bei 20 mg/kg 5-FU 10 %, bei der Kombination halber Tagesdosen 8%.

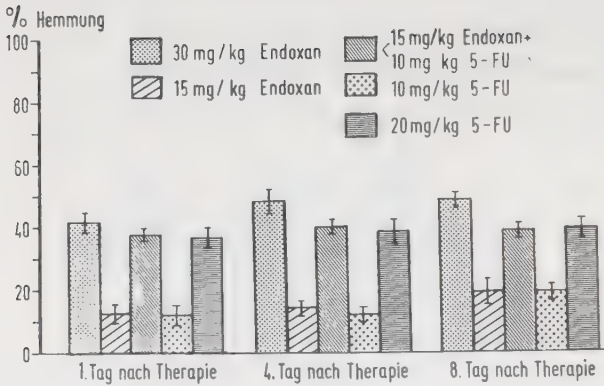
7.



Vergleich der Wachstumshemmung bei höherer Dosierung der angegebenen Substanzen: Endoxan 25 mg/kg, 5-FU 20 mg/kg, Kombination von 12,5 mg/kg Endoxan und 10 mg/kg 5-FU.

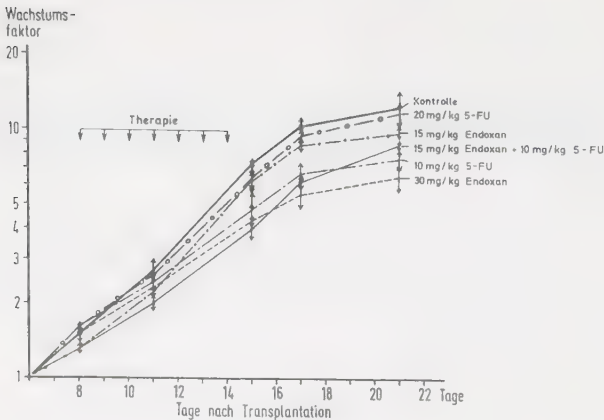
In einem weiteren Versuch erhöhten wir nochmals die Dosis von Endoxan auf 30 mg/kg, die von 5-FU blieb unverändert bei 20 mg/kg Körpergewicht (Abb. 8, 9).

8.



Vergleich der Wachstumshemmung bei hochdosierter Behandlung von Endoxan und 5-FU in ganzer TD, 1/2 TD und in Kombination bei halben Tagesdosen jeder Substanz.

9.



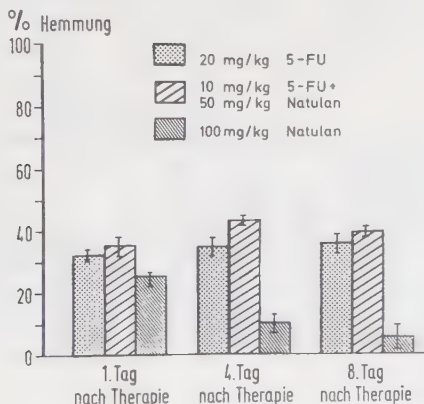
Vergleich des Wachstumsverhaltens bei gleicher Dosierung wie in Abbildung 8.

Wir verabreichten die ganze Tagesdosis, die 1/2 Tagesdosis 5-Fluoro-Uracil und Endoxan einzeln, die letztgenannte Dosis beider Substanzen zusammen. Bei dieser Dosierung verzeichneten wir am 1. Tag nach Therapie-Ende deutlich eine Potenzierung der Wirksamkeit, die wie in den Abbildungen 5-7 auf der Stufe einer Addition der Wirksamkeit beider Substanzen am 4.-8. Tag nach Therapie-Ende blieb, bei gleichzeitigem Wegfall einer Toxizität (Letalität 0%).

III. Kombination von 5-Fluoro-Uracil (5-FU) und Natulan:

Bei der Kombination von 5-FU mit Natulan begannen wir mit der maximal verträglichen Dosis (MTD) von Natulan (100 mg/kg). Die Dosis von 5-FU ließen wir auf 20 mg/kg wie im vorgehenden Versuch. Wir verabreichten wieder die Tagesdosis jeder Substanz einzeln und die 1/2 Tagesdosis beider Stoffe zusammen. Bei den kombiniert behandelten Tieren zeigte sich am ersten, vierten und achten Tag nach Therapie-Ende eine Addition der Wirkung ohne Toxizität.

10.

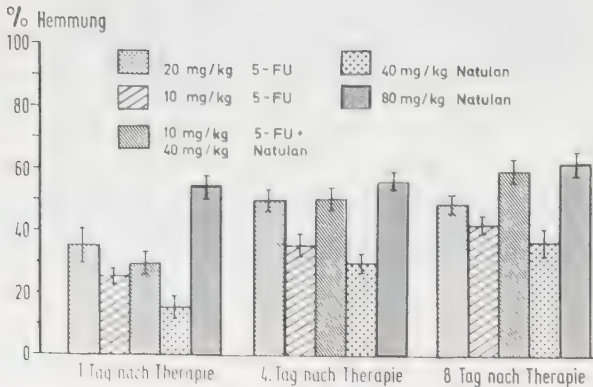


Einfluß hochdosierter Behandlung von Natulan in Kombination mit 5-FU. (Natulan 100 mg/kg)

Dagegen betrug bei den mit Natulan behandelten Tieren die Letalität 12 % (Abb.10).

Reduzierten wir die Tagesdosis von Natulan auf 80 mg/kg KG, so zeigte sich am 8. Tag nach Therapie-Ende der beste Effekt: Eine Addition bei einer Letalität von 10% bei 80 mg/kg Natulan, während sie bei der kombinierten Therapie 5% betrug (Abb.11).

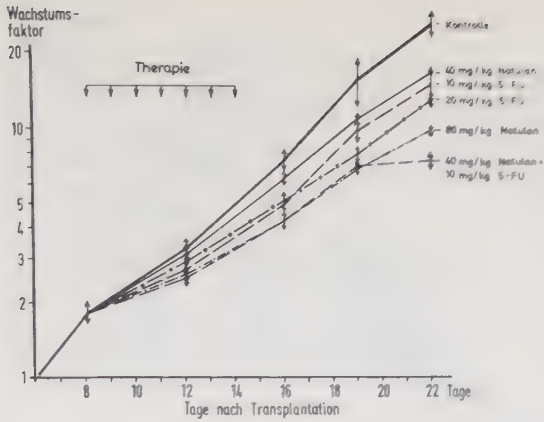
11.



Vergleich mittlerer Dosierung von Natulan bei gleicher Dosis von 5-FU in kombinierter Therapie.

Die Kurve des Wachstumsverhaltens bei den kombiniert behandelten Tieren lag in Abbildung 12 am 8. Tag unter den Werten der mit Natulan und 5-FU allein behandelten Tiere.

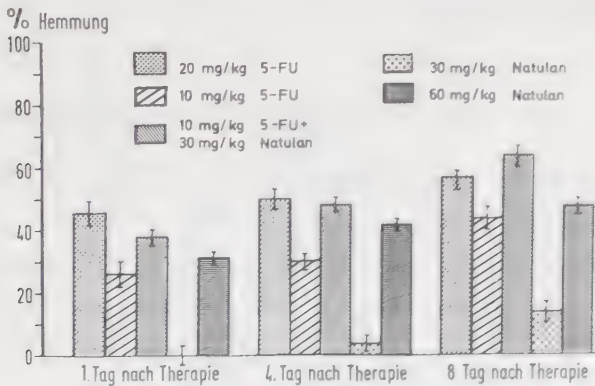
12.



Vergleich des Wachstumsverhaltens bei gleicher Dosierung wie in Abb. 11.

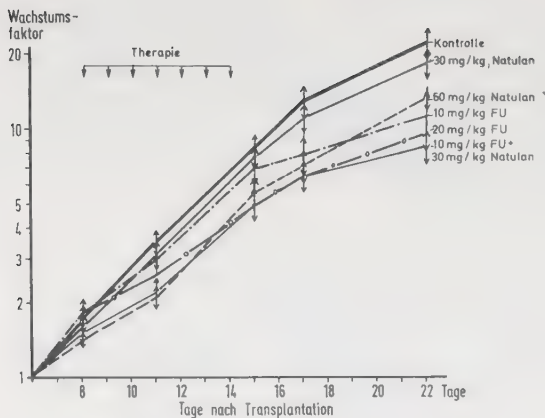
Bei Herabsetzung der Tagesdosis von Natulan auf 60 mg/kg, bei gleicher Dosierung von 5-FU wie in Abb. 11 fanden wir am 8. Tag nach Therapie-Ende den besten Effekt hinsichtlich der Tumorfremmung und der Toxizität (Letalität 0%) (Abb. 13, 14).

13.



Vergleich der Wachstumshemmung bei niedriger Dosierung von Natulan bei gleicher Dosis von 5-FU wie in Abb. 11.

14.



Wachstumsverhalten unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 13.

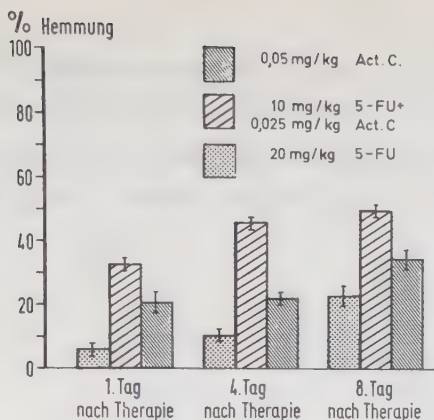
In Abbildung 14 lag die Kurve der Wachstumsfaktoren bei kombinierter Therapie niedriger als bei den mit einer Substanz allein behandelten Tieren.

IV. Kombination von 5-Fluoro-Uracil (5-FU) und ActinomycinC:

Bei der Kombination von Actinomycin C (Act.C) und 5-FU begannen wir mit der Maximaldosis von Act.C (0,05mg/kg) und der gleichen Dosis von 5-FU(20 mg/kg) wie in den vorgehenden Versuchen.

Hinsichtlich der Tumorerhennung und der Toxizität konnten wir am 1. Tag nach Therapieende von einem Synergismus sprechen. Die Letalität betrug am 8. Tag bei der Kombination 10 %, bei Verabreichung von 0,05 mg/kg Act.C ebenfalls 10 % (Abb.15).

15.

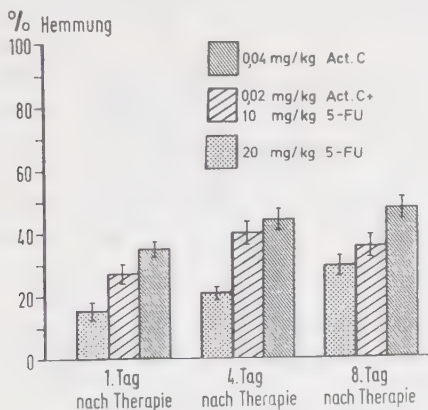


Wachstumshemmung bei hochdosierter Behandlung von Act.C in Kombination mit konstanter Dosis von 5-FU wie in Abb. 14.

Reduzierten wir die tägliche Dosis von Act.C auf 0,04 mg/kg, so nahm die Tumorerhemmung gegenüber dem vorhergehenden Versuch ab. Gemessen an der Toxizität war die kombinierte Therapie verträglicher als die Einzelverabreichung jeder Substanz (Letalität von 13 % bei 0,04 mg/kg Act.C, bei Kombination von 0%).

(Abb. 16)

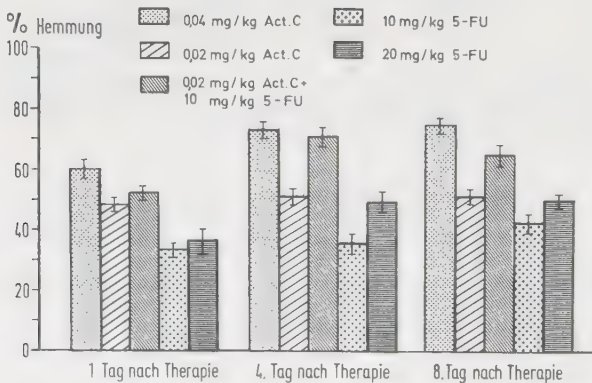
16.



Wachstumshemmung bei reduzierter Dosis von Act.C in Kombination mit konstanter Dosis von 5-FU wie in Abb. 15.

Um die Wirksamkeit dieser Kombination besser darzustellen, gaben wir die Tagesdosis oder 1/2 Tagesdosis jeder Substanz einzeln und die 1/2 Tagesdosis beider Substanzen zusammen als Kombinationstherapie wie in den vorhergehenden Versuchen. Dabei fanden wir am 4. Tag (Abb.17) eine Addition der Wirksamkeit.

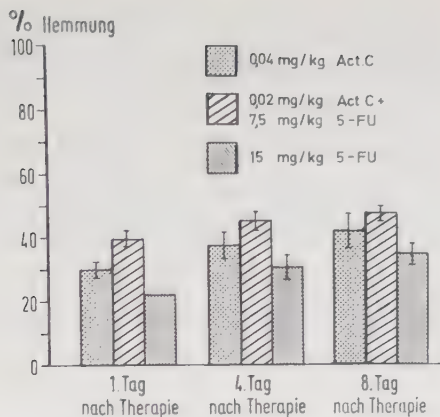
17.



Wachstumsverhalten bei konstanter Dosierung wie in Abb.16, nur aufgegliedert in 5 Gruppen verschiedener Dosierung.

Bei 15 mg/kg 5-FU als TD (Abb.18) und konstanter Act.C-Dosierung wie in Versuch 17 zeigte sich wie in den anderen Versuchen dieser Kombination eine Addition der Wirkung am 1. Tag, die bis zum 3. Tag stetig abnahm. Die Toxizität der "Kombinationstiere" war gegenüber derjenigen der "Act.C-Tiere" nicht erhöht. Beide Tiergruppen nahmen an Gewicht ab, hatten struppiges Fell und Diarrhoe. Die mit 5-FU behandelten Tiere unterschieden sich im Allgemeinzustand kaum von den Kontrolltieren.

18.

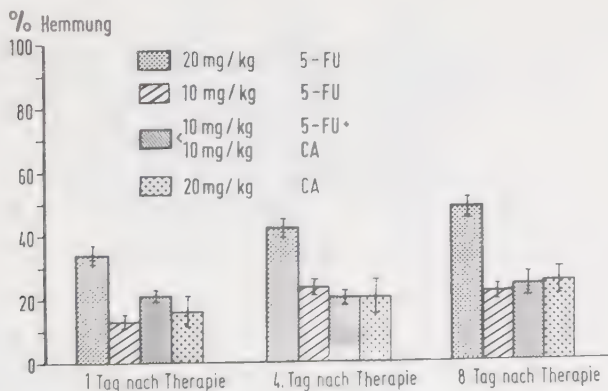


Reduzierte Dosis von 5-FU in Kombination mit konstanter Dosis von Act.C.

V: Kombination von 5-Fluoro-Uracil und Cytosin-Arabinosid (CA):

In dieser Versuchsreihe untersuchten wir die Wirksamkeit eines Zytostatikums bei zweimaliger täglicher Verabreichung der einen und einmaliger Gabe der anderen Substanz.

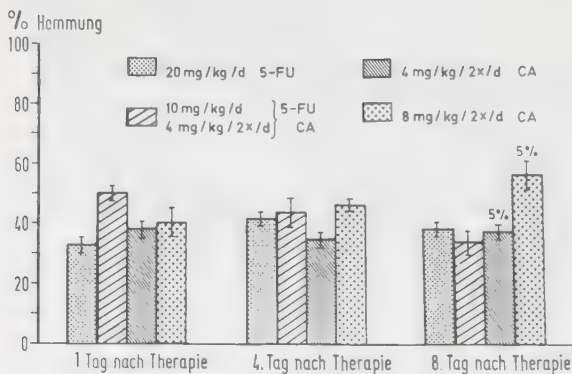
19.



Wachstumsverhalten bei Behandlung mit CA oder 5-FU allein und deren Kombination bei einmaliger Gabe von CA pro Tag.

Wir behielten die einmalige Gabe von 5-FU in einer Tagesdosis von 20mg/kg, 1/2 Tagesdosis von 10 mg/kg wie in den anderen Versuchen bei. Cytosin-Arabinosid (CA) gaben wir ebenfalls einmal in einer Tagesdosis von 20 mg/kg. (Abb.19) Die einzelnen Gaben der 1/2 Tagesdosis 5-FU und CA entsprachen in der Wirksamkeit der Kombination an allen drei Meßtagen nach Therapie-Ende.

20.



Wachstumsverhalten bei zweimaliger Injektion von CA täglich.

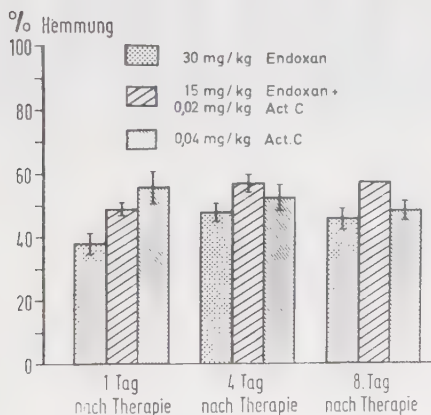
Injizierte man dagegen CA zweimal täglich im Abstand von zwei bis drei Stunden, wobei 5-FU zusammen mit der ersten Injektion gegeben wurde, so war die kombinierte Therapie am 1. Tag nach Therapie-Ende wirksamer als die Einzel-Verabreichung der Tagesdosis von 5-FU bzw. von CA. Hier trat also ein Synergismus auf. Nach weiteren vier Tagen war die Kombination wirksamer als die Tagesdosis von 5-FU, blieb aber unter der Wirksamkeit der Tages-

Dosis von CA. Damit ergab sich nur eine Addition. Am 8. Tag war die einzelne Verabreichung jedes Stoffes wirksamer als die Kombination.

VI. Kombination von Endoxan und Actinomycin C (Act.C):

Die Versuche mit der Kombination von Endoxan und Act.C führten wir mit fallender Dosierung von Endoxan bei gleichbleibenden Dosen von Act.C (0,04 mg/kg KG) durch. Bei dem ersten Versuch verabreichten wir 30 mg/kg KG Endoxan als Tagesdosis. Am 4. und 8. Tag nach Therapie-Ende war eine additive Wirksamkeit beider Substanzen zu verzeichnen. Die Letalität betrug am 8. Tag 9 % bei den kombiniert behandelten, bei den "Act.C-Tieren" 4 %.(Abb.21)

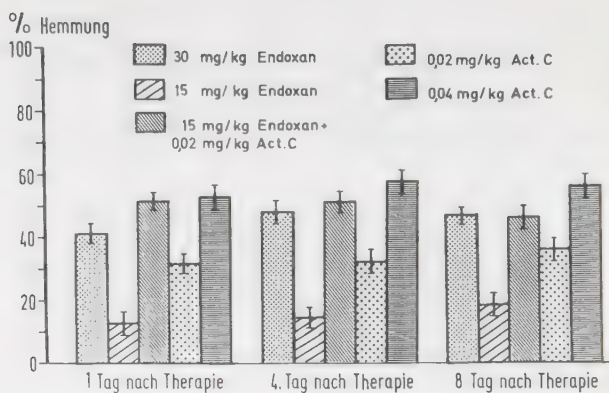
21.



Wachstumsverhalten bei hochdosiertem Act.C
in Kombination mit hochdosiertem Endoxan.

Wir untersuchten, ob bei geringerer Dosierung von Endoxan (30 mg/kg) die Wirkung der Kombination erhöht ist. So haben wir wieder je die Tagesdosis oder die 1/2 Tagesdosis von Endoxan und Act.C einzeln und die 1/2 Tagesdosis beider Substanzen in Kombination gegeben und konnten so eine additive Wirkung am 1. und 4. Tag finden, die am 8. Tag abnahm. (Abb.22)

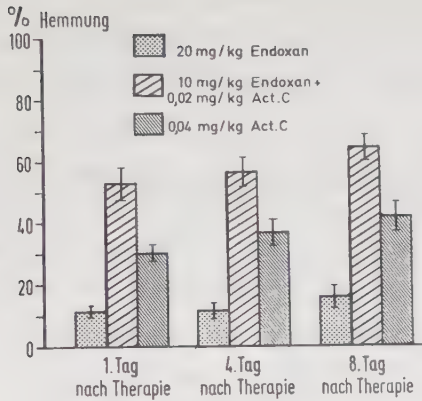
22.



Vergleich bei konstanter Dosierung wie in Abb.21, aufgliedert dargestellt.

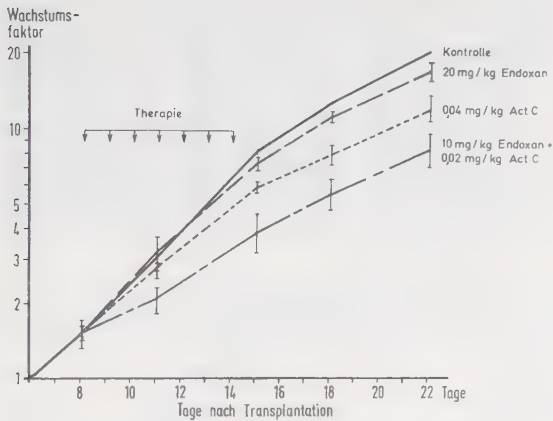
Bei Senkung der Dosis von Endoxan auf 20 mg/kg (Abb.23) zeigte sich die additive Wirkung deutlich. (Abb.24)

23.



Einfluss niedrig dosierter Behandlung von Endoxan in Kombination mit konstanter Act.C-Dosierung wie in Abb.22.

24.



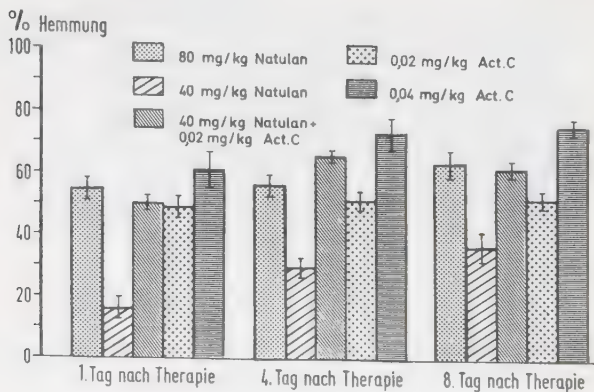
Wachstumsverhalten unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 23.

Die Kurve der kombinierten Therapie lag ab Therapie-Beginn unter den Werten der einzeln behandelten Tiere. Demnach wurde in dieser Versuchsreihe bei niedriger Dosierung von Endoxan bei der Kombination mit Act.C der beste Erfolg erzielt.

VII. Kombination von Natulan und Actinomycin C (Act.C):

In gleicher Weise führten wir die Versuche bei der Kombination von Natulan mit Act.C durch. Wir verabreichten wieder je die Tagesdosis von Act.C (0,04mg/kg) und Natulan (80 mg/kg) und die 1/2 Tagesdosis allein sowie in Kombination (Abb.25).

25.



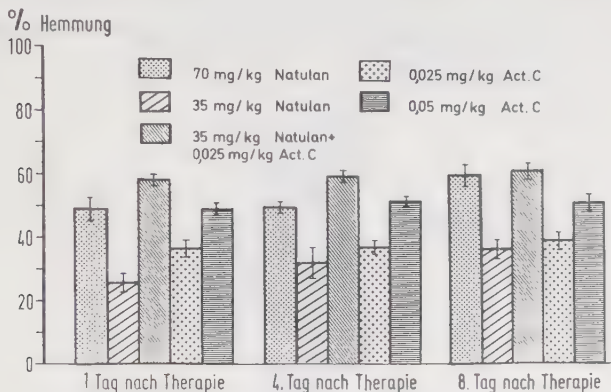
Vergleich hochdosierter Natulan-Therapie mit hochdosiertem Act.C und deren Kombination bei 1/2 TD.

Am 8. Tag nach Therapie-Ende war die alleinige Gabe von Natulan in der Tagesdosis als auch die von Act.C von gleicher oder grösserer Wirksamkeit als die Kombination. Lediglich hinsichtlich der Letalität liess sich ein positiver Effekt bei der Kombination

(0 %) verzeichnen. Bei der alleinigen Gabe von 80 mg/kg Natulan betrug sie dagegen 15 %.

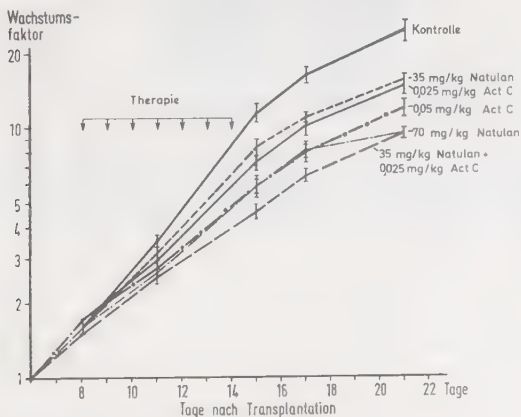
Injizierten wir nur 70 mg/kg Natulan als Tagesdosis und dafür 0,05 mg/kg Act.C (Abb.26, 27), jeweils in den Tagesdosen, 1/2 Tagesdosis allein und in Kombination, so waren die Substanzen zusammen verabreicht am 1. und 4. Tag wirksamer als in der Tagesdosis einzeln verabreicht, am 8. Tag aber ebenso wirksam, was am Kurvenverlauf in Abb. 27 deutlich wurde. Die Letalität betrug bei diesem Versuch in allen Gruppen 0 %.

26.



Kombinierte Therapie bei 1/2 MTD von Act.C und mittlerer Dosierung von Natulan.

27.



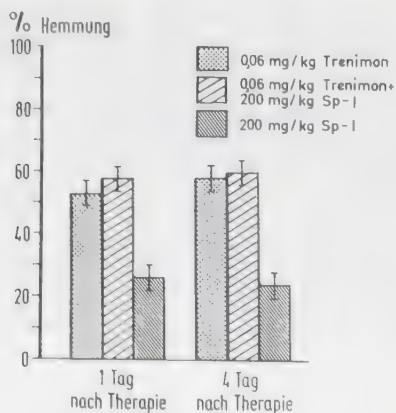
Wachstumsverhalten unter gleichen Bedingungen wie in Abb.26.

Insgesamt gesehen war die Injektion jedes Medikamentes mit der Tagesdosis ebenso wirksam wie die Kombination der halben Dosen.

VIII. Kombination von Trenimon und Proresid (SP-I):

Bei der Kombination von Trenimon und SP-I hatten wir drei Gruppen von behandelten Tieren: Eine Gruppe jeweils behandelt mit der Tagesdosis von Trenimon (0,06 mg/kg), der Tagesdosis von SP-I (200 mg/kg) und der Kombination mit jeweils ganzer Tagesdosis (Abb.28). In diesem Versuch erzielten wir bei der Kombination keinen positiven Effekt.

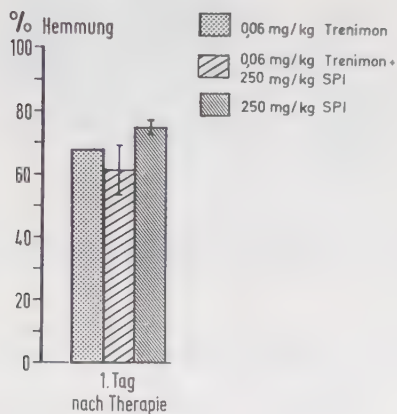
28.



Wachstumsverhalten bei Kombination von Trenimon und Sp-I, gemessen am 1. und 4. Tag nach Therapie-Ende.

Bei Erhöhung der Tagesdosis von SP-I auf 250 mg/kg entsprach die Tumorchemmung bei den Kombinationstieren (Abb.29) derjenigen der mit den einzelnen Substanzen in Höhe der Tagesdosis behandelten Tiere. Die Letalität betrug bei Injektion von 250 mg/kg SP-I 30 %, bei der Kombination beider Substanzen 20 %.

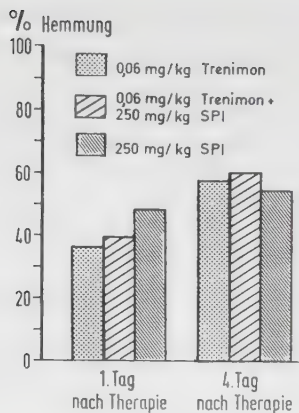
29.



Vergleich der Tumorchemmung bei der Kombination von Trenimon und SP-I jeweils in MTD.

Unter gleichen Bedingungen führten wir einen weiteren Versuch durch, bei dem am 4. Tag nach Therapie eine weitere Messung erfolgte, um den Verlauf zu beobachten (Abb.30). Es konnte auch hierbei kein besseres Ergebnis erzielt werden.

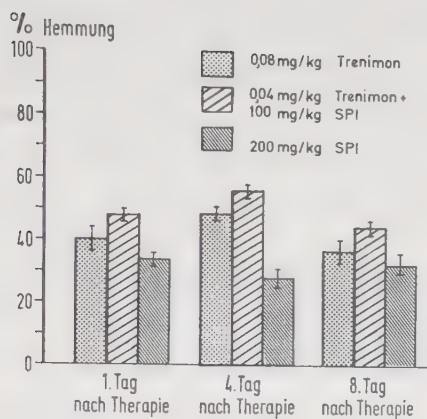
30.



Vergleich der Tumorchemmung bei gleicher Kombination, gleicher Dosierung, gemessen am 1. und 4. Tag nach Therapie-Ende.

In einem dritten Versuch gaben wir bei der dritten Gruppe wieder die 1/2 Tagesdosis beider Substanzen in Kombination (0,04 mg/kg Trenimon, 100 mg/kg SP-I - Abb.31). Die Tumorumfänge wurden wieder am 1., 4. und 8. Tag nach Therapie-Ende gemessen. Damit war die Belastung für die "Kombinationstiere" nicht größer als bei der Injektion nur eines Medikamentes. In diesem Versuch ließ sich eine Addition in der Wirksamkeit und dem Allgemeinbefinden (Letalität 0 %) der Tiere an den drei Meßtagen registrieren.

31.



Vergleich der Wachstumshemmung bei der Kombination von 1/2 TD Sp-I und 1/2 MTD Trenimon.

DISKUSSION:

So wie jedes einzelne Arzneimittel seine optimale Dosis und Verabreichungsweise hat, trifft dies auch für eine Kombination von Arzneimitteln zu. Allerdings ist die Ermittlung dieser Werte notwendigerweise viel komplizierter, da die in Betracht kommenden Kombinationen nahezu unbegrenzt sind. Darüberhinaus können die Auswirkungen jeder einzelnen Kombination nur beurteilt werden, wenn der optimale Wirkungsgrad jeder einzelnen Komponente gesondert ermittelt ist. Die Versuche mit kombinierten Chemotherapeutika dürfen sich auch nicht nur auf eine reine Addition der Substanzen beschränken; es muß vielmehr ganz besonders darauf geachtet werden, daß bei sämtlichen Versuchsanordnungen die einzelnen Komponenten der jeweiligen Kombination so umfassend wie möglich variiert werden. Nur so läßt sich die Überlegenheit einer Kombinationstherapie gegenüber der Verabreichung von einzelnen Substanzen ermitteln.

In der hier vorgelegten Studie wurden ausschließlich Zweierkombinationen ausgewertet, wobei jeweils die halbe "Optimaldosis" der beiden Substanzen in Kombination verabreicht wurde. Unter "Optimaldosis" war in diesem Zusammenhang nicht die therapeutische Höchstdosis zu verstehen. Bei gesonderter Verabreichung von je einer der beiden Komponenten lag die "Optimaldosis" mehr oder weniger deutlich unter der jeweiligen maximalen verträglichen Dosis. Das erforderliche Maß der Reduzierung wurde folgendermaßen ermittelt: Wenn bei Verabreichung von jeweils der $1/2$ maximal verträglichen Dosis der beiden

Komponenten in Kombination eine z.B. um 10 % höhere Wirtst-
sterblichkeit eintrat als bei den Kontrolltieren (LD_{10}),
wurden die Dosen jeder Kombinationskomponente so weit redu-
ziert, bis bei der Kombination die Letalität unter 10 % lag.
Dann wurde der Anti-Tumor-Effekt der Kombination bestimmt.
Andere Verabreichungsmethoden von Kombinationen als die hier
praktizierte gleichzeitige Gabe können sehr wohl zu anderen
Resultaten führen.

Unter den verschiedenen Zweier-Kombinationen, die in diesen
Versuchen getestet wurden, konnte ein definitiver Synergis-
mus bei der Kombination von Actinomycin C und Endoxan gefun-
den werden. Einen Synergismus konnte C.G.Schmidt (14) mit
einer ähnlichen Kombination aufzeigen, nämlich mit Endoxan
und Mitomycin C in äquitoxischen Dosen am Jensen-Sarkom an
Ratten. Der Synergismus bestand in einer erhöhten Tumorrhemmung
bei gleichen Nebenwirkungen. - In der Klinik wurde die gleiche
Kombination mit Erfolg an Bronchial-Carzinomen mit Metastasen
in Leber und Lymphknoten, am Ösophagus-Carcinom, am Wilmstumor
und Sympathogoniom bei Kindern erprobt (15).

Eine deutliche Addition, vielleicht sogar eine synergistische
Wirkung konnte bei der Kombination von 5-Fluoro-Uracil und
Methotrexat beobachtet werden. Wegen ihrer verschiedenen An-
griffspunkte in der Biosynthese der Nukleinsäuren beruht
offensichtlich der Synergismus dieser beiden Substanzen auf
einem Sequenzblock. Einen ähnlichen Effekt fanden Kline und
Venditti (7) bei Mäusen mit Leukämie L 1210, wenn niedrige,

allein unwirksame Dosen von 5-Fluoro-Uracil und hohe bis maximale Dosen von Methotrexat verwendet wurden. Die optimale Dosis bestand bei ihren Versuchen in 80 mg/kg 5-Fluoro-Uracil und 10 mg/kg Methotrexat. Diese Dosierung war wirksamer als 320 mg 5-Fluoro-Uracil oder 80 mg Methotrexat allein gegeben.

In unserer Versuchsreihe war bei der kombinierten Therapie die $1/2$ maximal tolerierbare Dosis wirksamer als die jeweilige maximal verträgliche Dosis allein gegeben. Wirksamer als die $1/2$ maximal tolerierbare Dosis beider Substanzen war eine niedrigere Dosierung beider Stoffe, nämlich 7,5 mg/kg 5-Fluoro-Uracil und 0,4 mg/kg Methotrexat; d.h. die Toxizität war in dieser Dosierung geringer als bei der $1/2$ maximal tolerierbaren Dosis.

Die oben erwähnten Autoren konnten in einer weiteren Versuchsreihe feststellen, daß die Kombination dieser beiden Antimetaboliten um 11 %, 33 % und 57 % wirksamer als die einzelne Gabe von Methotrexat war (16). Dabei war eine höhere Dosis von Methotrexat in der Kombination besser verträglich als bei Einzelverabreichung. Die Toxizität war nur gering erhöht.

Die Kombination der alkylierenden Substanz Trenimon und des Mitosehemmers SP-I ergab definitiv eine Addition, vielleicht sogar einen Synergismus.

Bei den übrigen Kombinationen dieser Versuchsreihe (Actinomycin C und 5-Fluoro-Uracil, Endoxan und 5-Fluoro-Uracil, Cytosin-Arabinosid und 5-Fluoro-Uracil) konnte lediglich eine Addition festgestellt werden, obwohl auch diese Substanzen sich in ihrem Wirkungsmechanismus oder in den biochemischen Angriffspunkten unterschieden.

Wegen der äußerst schwierigen Natur solcher kombinierter chemotherapeutischer Experimente wurde diese Studie nicht in der Hoffnung unternommen, eine bestimmte Kombination mit synergistischen Ergebnissen herauszufinden, die zu ähnlichen Studien am Patienten ermutigen könnten. Trotzdem sollten unsere Ergebnisse mit Actinomycin C in Kombination mit Endoxan zu weiteren Untersuchungen in dieser Richtung anregen, vor allem bei der Behandlung ähnlicher solider Tumoren wie bei dem hier verwendeten transplantierten Human-Carcinom.

ZUSAMMENFASSUNG:

Die Serientransplantation menschlicher Tumoren in Laboratoriumstiere stellt ein Testmodell zur Erfassung tumorhemmender Wirkung dar. Der Tumorstamm HAd.Nr.1 - ein aus dem Colon stammendes Adeno-Carcinom - wächst in der Backentasche von Goldhamstern gut reproduzierbar, ohne daß eine Vorbehandlung der Wirtstiere wie bei den meisten immunologisch fremden Gewebsüberpflanzungen notwendig ist.

In dieser Arbeit haben wir bei Kombination zweier verschiedener Zytostatika eine stärkere Tumorhemmung erzielen können als bei Einzelverabreichung dieser Substanzen. An diesem Tumor haben wir folgende Zytostatika in verschiedener Dosierung jeweils bei 1/2 Tagesdosis einzeln und in Zweier-Kombination bei 1/2 Tagesdosis untersucht:

5-Fluoro-Uracil, Methotrexat, Cytosin-Arabinosid, Endoxan, Trenimon, Actinomycin C, SP-I und Natulan.

Bei der Kombination von zwei Zytostatika konnte ein Hemmeffekt auf das Tumor-Wachstum beobachtet werden. Die Kombinationen von Actinomycin C und 5-Fluoro-Uracil, Endoxan und 5-Fluoro-Uracil, Natulan und 5-Fluoro-Uracil, Cytosin-Arabinosid und 5-Fluoro-Uracil sowie SP-I und Trenimon ergaben eine additive Wirkung. Im letzten Falle sowie bei den Kombinationen von 5-Fluoro-Uracil und Methotrexat bzw. Endoxan und Actinomycin C wurde eine synergistische Wirkung angedeutet. Die Kombination von Natulan mit Actinomycin C war nur wenig wirksam. Insgesamt war festzustellen, daß bei niedriger Dosierung bessere Erfolge zu erzielen waren als bei maximal verträglichen Dosen.

LITERATUR:

1. HEILMEYER L., Der gegenwärtige Stand der Chemotherapie der Neoplasien. Med.Klin. 60, 649 (1965)
2. KUEMMERLE H.P., Die Nebenwirkungen der Zytostatika. Ther. Gegenw. 105, 780 (1966)
3. GOLDIN A., MANTEL N., The Employment of Combinations of Drugs in the Chemotherapy of Neoplasia. A Review. Canc.Res. 17, 635 (1957)
4. BASERGA R., The Relationship of the Cell Cycle to Tumor Growth and Control of Cell Division. Canc.Res. 25, 581 (1965)
5. GOLDIN A., Studies on the Mechanism of Action of Chemotherapeutic Agents in Cancer. Synergistic Action of Drugs on a Transplantable Leukemia in Mice. Canc.Res. 5, 153 (1952)
6. MANTEL N., An Experimental design in Combination Chemotherapy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 76, 909 (1958)
7. KLINE I., VENDITTI M., The Antileukemic Effectiveness of 5-FU and MTX in the Combination Chemotherapy of Advanced Leukemia L 1210 in Mice. Canc.Res. 26, 848 (1966)
8. KORNGOLD L., The Distribution of Human Tissue Antigens in Five Human Tumors Grown in Rats and Hamsters. Canc.Res. 16, 956 (1956)
9. TOOLAN H.W., Permanently Transplantable Human Tumors Maintained in Conditioned Heterologous Hosts: H.Chon No1, HEP No4 and HAd No1. Canc.Res. 17, 418 (1957)
10. HALEY H.B., STROUDA N., Constancy of Chromosome Karyotype in Human Tumors HAd No1 and HEP No3 Maintained in Laboratory Animals. Canc.Res. 24, 639 (1964)
11. GOLDENBERG D.M., WITTE S., HINDRINGER B., HARTMANN G., Zur experimentellen Chemotherapie eines menschlichen Adeno-Ca in der Backentasche des Goldhamsters. Arzneim.-Forsch. 16, 808 (1966)
12. HERTZ R., Choriocarcinoma of Women Maintained in Serial Passage in Hamsters and Rat. Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.) 102, 77 (1959)

13. COHEN S.S., FLAKS I.G., BARNER H.D., LEOB M.R., LICHTENSTEIN I., The Mode of Action of 5-Fluoro-Uracil and its Derivates. Proc.Nat.Acad.Sc. 44, 1004 (1958)
14. SCHMIDT C.G., In: Plattner (ed): Preliminary Report on Combined Chemotherapy with Mitomycin C and Cyclophosphamide. Proc.Int.Symp. Chem. of Canc. 162 (1964)
15. SCHMIDT C.G., Der derzeitige Stand und Wirkungsmechanismus der Zytostatika. Krebsf., Krebsbek. 6, 309 (1967)
16. VENDITTI I., COLDIN A., HUMPHREYS S. R., Investigation of the Activity of Cytosan against Leukemia L 1210 in Mice. Canc.Res. 19, 986 (1959)
17. GOLDENBERG D.M., Die Verwendung einiger neuer Human-Tumorstämme in der experimentellen Krebsforschung. Arch. Geschwulstforsch. 29, 1 (1967)
18. GOLDENBERG D.M., The Human Tumor - Hamster Host Testing Model. A Reappraisal. 4th Ann.Meet.Amer.Soc.Chir.Onc. Abstract 10, 12 (1968)
19. GOLDENBERG D.M., WITTE S., ELSTER K., GW-39: A New Human Tumor Serially Transplantable in the Golden Hamster. Transplant. 4, 760 (1966)
20. GOLDENBERG D.M., WITTE S., Chemotherapy of two Morphologically Similar Human Tumors Growing in the Cheek Pouch of the Golden Hamster: HAD No1 and GW-39. Europ.J.Canc. 3, 95 (1967).

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen
Dank aussprechen:

Herrn Prof.Dr.S. W i t t e für die Überlassung des
Themas und seinen bereitwilligen Rat während der
Untersuchungen und bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 26. Januar 1943 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. med. Hermann Münk und seiner Ehefrau Marie, geb. Hofmann, in Nürnberg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Nürnberg trat ich im Herbst 1953 in die Wilhelm-Löhe-Schule in Nürnberg (Mädchen-Realgymnasium) ein, wo ich im Sommer 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Mit dem Wintersemester 1962/63 nahm ich an der Universität Erlangen das Studium der Medizin auf. Im Juli 1968 bestand ich hier die Ärztliche Prüfung. Nach meiner Verheiratung leistete ich die Medizinalassistentenzeit ab: Von September 1968 bis Januar 1969 an der Dermatologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München-Schwabing, von November 1969 bis Februar 1970 an der I. Medizin und von März bis Juni 1970 an der I. Chirurgie des städtischen Krankenhauses Nürnberg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
